

⑯ BUNDESREPUBLIK

DEUTSCHLAND



DEUTSCHES

PATENTAMT

Offenlegungsschritt
⑯ DE 34 10631 A1

⑯ Int. Cl. 3:

A 61 K 35/12

A 61 K 37/64

A 61 L 15/00

DE 34 10631 A1

⑯ Aktenzeichen: P 34 10 631.6
⑯ Anmeldetag: 22. 3. 84
⑯ Offenlegungstag: 27. 9. 84

⑯ Unionspriorität: ⑯ ⑯ ⑯

23.03.83 IL 68218

⑯ Anmelder:

Ramot University Authority for Applied Research
and Industrial Development Ltd., Tel Aviv, IL

⑯ Vertreter:

Vossius, V., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.; Vossius, D.,
Dipl.-Chem.; Tauchner, P., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.;
Heunemann, D., Dipl.-Phys. Dr.rer.nat.; Rauh, P.,
Dipl.-Chem. Dr.rer.nat., Pat.-Anw., 8000 München

⑯ Erfinder:

Itay, Samuel, Dr., Kfar Saba, IL; Nevo, Zvi, Dr.,
Herzlia, IL

Behördeneigentum

⑯ Implantationsmaterial zur Wiederherstellung defekter Knorpel und Knochen

Beschrieben ist Implantationsmaterial zur Wiederherstellung von Knorpel- und Knochendefekten. Das Implantationsmaterial liegt entweder in Gelform vor oder eingebettet in natürliches oder künstliches Knochenmaterial. Das Gel enthält bestimmte Arten von Zellen. Diese Zellen können embryonale Chondrocyten oder Mesenchymzellen sein, die sich im allgemeinen unter dem Einfluß von chondrogenen Induktionsfaktoren in Knorpelzellen überführen lassen. Ferner enthält das Gel Fibrinogen, eine Antiprotease und Thrombin. Die Zellen sollen artspezifisch sein. Vorzugsweise werden dem Gel auch eine extrazelluläre Matrix (ECM) von Chondrocyten, andere Wachstumshormone und/oder Wachstumsfaktoren, wie SM (Somatomedin = IGF-I), FGF (Fibroblastenwachstumsfaktor), CGF (Knorpelwachstumsfaktor), BDGF (Knochenwachstumsfaktor) oder eine Kombination dieser Substanzen zugegeben.

DE 34 10631 A1

5 u.Z.: S 887 (Vo/kä)
Case: 50 158

10 Ramot University Authority for Applied Research
and Industrial Development Ltd.
10 Tel-Aviv, Israel

15 " Implantationsmaterial zur Wiederherstellung defekter
Knorpel und Knochen "

15

P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Implantationsmaterial zur Wiederherstellung von Gelenkknorpel- und Knochendefekten, gekennzeichnet durch einen Gehalt artspezifischer embryonaler Chondrocyten oder von Mesenchymzellen, die durch Induktionsfaktoren in Knorpelzellen überführbar sind, zusammen mit einem biologischen Leim aus Fibrinogen, Thrombin sowie einem natürlichen oder chemischen Proteaseinhibitor.
2. Implantationsmaterial nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch einen Gehalt von 100 000 bis 500 000 Chondrocyten oder Mesenchymzellen pro ml.
3. Implantationsmaterial nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch einen Gehalt von 5 bis 20 mg/ml einer extrazellulären Matrix (ECM).

35

- 1 4. Implantationsmaterial nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch einen Gehalt an einem lokalen Wachstumsfaktor oder einem hormonellen Wachstumsfaktor.
- 5 5. Implantationsmaterial nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß der lokale Wachstumsfaktor aus Knorpel (CDF) oder Knochen (BDGF) stammt.
- 10 6. Implantationsmaterial nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß der hormonelle Wachstumsfaktor Somatomedin aus Serum oder der Hypophyse stammt.
- 15 7. Implantationsmaterial nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellen Chondrocyten oder Zellen sind, die sich von Bindegewebe mit undifferenzierten Mesenchymzellen ableiten, die in Kulturen proliferieren und in Chondrocyten überführbar sind.
- 20 8. Implantationsmaterial nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß das Material in geformten, gefriergetrockneten (Kiel) oder künstlichen Knochen eingebettet ist.
- 25 9. Verwendung des Implantationsmaterials nach Anspruch 1 bis 8 zur Wiederherstellung von Epiphysenknorpel und Knochen.
- 30 10. Implantationsmaterial zur Wiederherstellung von Gelenkknorpel- und Knochendefekten, gekennzeichnet durch einen Gehalt an geeignet geformtem Knochenmaterial, das mit einem Gel aus Thrombin, einer Antiprotease und Fibrinogen imprägniert ist, zusammen mit einer extrazellulären Matrix (ECM) oder mit einem lokalen oder hormonellen Wachstumsfaktor und gegebenenfalls einer geringen Menge artspezifischer embryonaler Chondrocyten oder Mesenchymzellen, die durch Induktionsfaktoren in Knorpelzellen überführbar sind.

1

5 Die Erfindung betrifft Implantationsmaterial zur Wiederher-
stellung von Gelenkknorpel- und Knochendefekten. Das Implantations-
material kann entweder in Form eines Gels vorliegen oder
zusammen mit natürlichen oder künstlichen Knochen als Trä-
germaterial. Das Implantationsmaterial der Erfindung eignet
10 sich vor allem zur Wiederherstellung defekter Gelenkknor-
pel, da diese besonders schwierige biologische Strukturen
darstellen. Das Implantationsmaterial der Erfindung ent-
hält eine Kombination embryonaler Chondrocyten oder be-
stimmter Mesenchymzellen, die in Knorpelzellen unter dem
15 Einfluß von chondrogenen Induktionsfaktoren überführbar
sind, sowie geeignete Mengen Fibrinogen, Thrombin und eines
Proteaseinhibitors (Antiprotease) als biologischen Leim.
Die erhaltenen Gele lassen sich längere Zeit lagern, wenn
sie in gleicher Weise gelagert werden wie Gewebekulturen.
20 Sie lassen sich transportieren und leicht handhaben.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform kann den Gelenk eine
extrazelluläre Matrix (ECM) oder bestimmte Wachstumsfakto-
ren, wie SM, FGG, CGF, BDGF oder eine Kombination dieser
25 Wachstumsfaktoren zugegeben werden. Zur Wiederherstel-
lung von Knochendefekten können sie als Implantationsmaterial ein-
gesetzt werden, das geeignet geformte Knochenteile einge-
bettet in diesen Gelenk enthält.

30 Bei der Beschädigung von Gelenkknorpeln durch Verletzungen,
Infektionen oder degenerative Prozesse erfolgt im allgemei-
nen keine Heilung oder Besserung. Es wurden bereits Versu-
che unternommen, osteochondrale Verpflanzungen durchzu-
führen und verschiedene Prothesen zu entwickeln, doch wa-
ren die Ergebnisse schlecht und entmutigend. Es sind auch
35 Versuche zur Verwendung gezüchteter Chondrocyten als Quel-

1 le für Knorpeltransplantate bekannt geworden, doch war die Integration der Transplantate in die benachbarten Knorpel im allgemeinen unbefriedigend.

5 Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, Implantationsmaterial zur Wiederherstellung von Gelenkknorpel- und Knochen- defekten zur Verfügung zu stellen, das bestimmte Zellen, näm- lich embryonale Chondrocyten oder aus Mesenchym stammende Zellen enthält, die sich *in vitro* oder *in vivo* in Knorpel- 10 zellen unter dem Einfluß von chondrogenen Induktionsfaktoren überführen lassen. Dieses Implantationsmaterial liegt in einem geeigneten biologischen Milieu und als Gel vor. Eine weitere Aufgabe der Erfindung ist es, ein Verfahren zur Herstellung 15 des Implantationsmaterial zu entwickeln.

Das Implantationsmaterial wird folgendermaßen hergestellt: Embryonale Chondrocyten (junge Chondrocyten) werden aus Embryonalgewebe durch Trypsinbehandlung und mechanische Zer- 20 legung gewonnen und in einem geeigneten Medium gezüchtet. Die Zellen werden danach geerntet und mit Fibrinogen, einem Protease- inhibitor (Antiprotease) und Thrombin vermischt. Es wird ein Gel erhalten, das in einem Inkubator eine gewisse Zeit aufbe- wahrt werden kann. Die geernteten Zellen können auch längere Zeit tiefgefroren aufbewahrt werden. Unmittelbar vor der Ver- 25 wendung wird das Material aufgetaut. Das Gel wird vor der Implantation in eine Lösung von Fibrinogen getaucht. Nun wird der Defekt mit einer Thrombinlösung besprüht und dann mit dem Implantationsmaterial aufgefüllt. Durch Versuche an Vögeln und Säugern wurde nachgewiesen, daß Gelenkknorpel- und Kno- 30 chendefekte sich gut auffüllen. Dies zeigte eine Untersu- chung nach 2 bis 12 Monaten nach der Implantation.

1 Das Implantationsmaterial der Erfindung eignet sich zur Wie-
derherstellung defekter humaner Gelenkknorpel oder Knochen.
Die Ursache des Defektes kann Trauma oder Altersverschleiß
sein. Das Verfahren kann zur Wiederherstellung der ver-
5 schiedensten Knorpel- und Knochendefekte in Frage kommen,
einschließlich degenerativer Veränderungen und Brüche im
Gelenkbereich.

10 Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform enthält das Implan-
tationsmaterial eine bestimmte Menge einer extrazellulären
Matrix (ECM) von embryonalen Chondrocyten, die auf eine be-
stimmte, nachstehend geschilderte Weise gewonnen werden.
Die extrazelluläre Matrix fördert das Wachstum der Chondro-
cyten nach Implantation des Materials.

15 Die Chondrocyten werden aus artspezifischem embryonalem
Epiphysengewebe erhalten, mit anderen Worten, das embryona-
le Epiphysengewebe wird der gleichen Art entnommen, der
später das Material der Erfindung implantiert werden soll.
20 Allogene Zellen ergeben befriedigende Ergebnisse, ohne daß
man auf HLA-Typisieren angewiesen ist. Für die Humanmedizin
werden humane embryonale Chondrocyten gezüchtet.

25 Es wurde festgestellt, daß die Zahl der Chondrocyten pro
Volumeneinheit einen bestimmten Wert nicht übersteigen soll,
da sonst Zellnekrosen erfolgen und schlechtere Ergebnisse er-
halten werden. Typische Werte für Chondrocytenkonzentrationen
sind etwa 100 000 bis 500 000 pro ml des Gels. Es werden et-
wa 5 bis 50 Einheiten Thrombin pro ml und etwa 25 bis
30 80 mg/ml Fibrinogen verwendet. Im allgemeinen wird der
Proteaseinhibitor dem Implantationsmaterial zugesetzt, um
eine rasche Lysis des Gels zu verhindern oder zu unter-
drücken. Es können natürliche oder synthetische Protease-
inhibitoren verwendet werden. Beispiele für geeignete che-
35 mische Proteaseinhibitoren sind ϵ -Aminocapronsäure, die in
einer Menge von 10 bis 20 mg/ml Gel verwendet wird, und
Tranexamsäure, die in einer Menge von 1 bis 2 mg/ml Gel ver-

1 wendet wird. Es können auch natürliche Proteaseinhibitoren
verwendet werden, wie Antitrypsin (Hühnereiweiß, Sigma,
Typ III) in einer Konzentration von 50 bis 75 µg/ml. Sofern
eine langsame Bildung des Gels erwünscht ist, werden 5 bis
5 10 Einheiten/ml Thrombin verwendet. Wenn das Gel rasch fest
werden soll, werden etwa 20 bis 50 Einheiten/ml Thrombin
verwendet.

10 Außerdem ist es vorteilhaft, dem Gel einen oder mehrere Wachs-
tumsfaktoren des lokalen Typs, wie ECM oder BDGF, oder des
hormonellen Typs, wie Somatomedin (SM)-ähnliche Peptide,
Knorpelwachstumsfaktor (CGF) und dergl. zuzufügen. Die
Wachstumsfaktoren werden in folgenden Mengen verwendet:
15 ECM einige mg/ml, BDGF etwa 100 µg/ml, CGF einige Nanogramm/ml,
SM einige Nanogramm/ml.

20 -Medium
Das Implantationsmaterial kann überschichtet mit F-12 /sowie
10 % fetalem Kälberserum einige Wochen in einem CO₂-Inkubator
bei 37°C aufbewahrt werden. Das gelartige Implantationsma-
terial ist sofort verwendbar und kann unmittelbar auf den
wiederherstellenden Bereich aufgebracht werden.

25 Für bestimmte Wiederherstellungsmaßnahmen, ist es zweckmäßig,
Implantationsmaterial zu verwenden, das aus einer Knochen-
struktur (natürlich oder künstlich) besteht
20 /eingebettet in ein Gel
der Erfindung, d.h. ein Gemisch aus Thrombin, Antiprotease,
Fibrinogen und einem oder mehreren Wachstumsfaktoren und/
oder-hormonen sowie einer geringen Konzentration der vorge-
nannten Arten von Zellen oder sogar ohne diese Zellen. Im
30 letzten genannten Fall dringen Zellen aus der Umgebung lang-
sam in das Implantat ein und bilden eine zusammenhängende
Masse zwischen Umgebung und Implantat.

35 Die Beispiele erläutern bevorzugte Ausführungsformen.

1

B e i s p i e l 1

5

Herstellung eines Implantationsmaterial zur Wiederherstellung von Knorpeldefekten

10

Als Ausgangsmaterial werden die Epiphysen von langen Knochen (Tibia, Femur) verwendet.

15

Zur Isolierung embryonaler Chondrocyten (junger Chondrocyten) werden die Epiphysen einer energischen Trypsinbehandlung unterworfen, d.h. 45 Minuten auf einer Drehschüttelmaschine in einem Wasserbad mit einer Trypsinkonzentration von 1 % behandelt und gleichzeitig mit einem Homogenisator mechanisch aufgebrochen. Dann wird das Trypsin durch Zugabe von Serum inaktiviert, das antiproteolytische Substanzen enthält. Die erhaltenen Suspension von Einzelzellen wird sodann mehrere Tage (6 bis 10 Tage) in einem flüssigen Ham F-12 Medium auf Platten überimpft, die mit Weichagar (0,6 % Agär, enthaltend Ham F-12 Medium) beschichtet sind. Während dieser Wachstumsperiode sterben die meisten Fibroblasten ab und es erfolgt eine Anreicherung an Chondrocyten. Die Zellen von den Weichagarplatten werden sodann in Spinner-Flaschen überführt und in F-12 Medium in Suspension weitere 3 bis 10 Tage gezüchtet. Die Wachstumsbedingungen in Spinner-Flaschen fördern die bevorzugte Bildung von Chondrocyten gegenüber Fibroblasten. So dann werden die Zellen aus den Spinner-Flaschen abgeschleudert und unmittelbar verwendet oder in 20prozentigem fetalem Kälberserum mit 10 % Dimethylsulfoxid und 70 % F-12 Medium bei der Temperatur des flüssigen Stickstoffs eingefroren. Das beim Zentrifugieren der Chondrocyten erhaltene Sediment wird in einem geringen Volumen Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung mit 50 mg/ml Fibrinogen oder einem anderen serumpräzitierenden Protein und einem Trypsininhibitor (50 µg/ml, Sigma Typ III) oder einer anderen Antiprotease suspendiert.

35

1 Die jüngste Lösung, die Zellen (je nach Alter in der Kultur und der Größe in einer Konzentration von 1 bis 5×10^5 /ml) sowie Fibrinogen und Trypsininhibitor enthält, wird als Lösung A bezeichnet. Eine Mikrotestplatte (96 F Nunc Dänemark 5 mit Ausguß) oder eine Zelle mit vielen Näpfchen wird mit 30 μ l Thrombinlösung (Lösung B) (1U/30 ml 40 mM CaCl₂) in jedes Näpfchen versetzt und gleichmäßig am Boden und an der Seitenwand verteilt. Sodann werden 90 μ l der Lösung A zugegeben. Hierauf lässt man das Gemisch gelieren.

10 Erforderlichenfalls kann die Endmenge geändert werden, wobei das Volumenverhältnis von Lösung A zu Lösung B auf einen Wert von 3 : 1 eingestellt wird. Das mit 0,2 ml F-12 Medium überschichtete Gel lässt sich etwa 14 Tage in einem Inkubator mit 15 5 bis 10 % CO₂ enthaltender Luft oder in tiefgefrorenem Zustand aufbewahren.

Vor der Transplantation wird der defekte Bereich vorsichtig mit einer Thrombinlösung besprüht. Das Gel wird vor der Transplantation in eine Lösung getaucht, die Fibrinogen und Trypsin-inhibitor (50 mg/ml bzw. 50 μ g/ml) enthält. Sodann wird das Material in den defekten Bereich eingedrückt und dieser Bereich aufgefüllt.

25 Anstelle von embryonalen Chondrocyten können auch embryonale Mesenchymzellen (Stufe 24) oder Knochenmark-Stammzellen verwendet werden. Außerdem kann jedes erwachsene Bindegewebe mit darin enthaltenen undifferenzierten Mesenchymzellen verwendet werden, die in Kultur Zellen bilden und schließlich 30 durch Selbstdifferenzierung oder gesteuert durch chondrogene Faktoren in Chondrocyten überführt werden.

Für genetisch identische (syngene) Transplantate können homogeneische Mesenchymzellen verwendet werden, die in erwachsenem Gewebe 35 des Empfängers enthalten sind, z.B. Hautfibroblasten, Knochenmarkzellen, die durch Biopsie erhalten werden, und die

1 Zellen in Kultur bilden, die in Chondrocyten überführbar sind.

B e i s p i e l 2

5

Herstellung eines Gels, das ECM (extrazelluläre Matrix) enthält

a) Herstellung von ECM

10 Embryonale Hühnerchondrocyten, die 14 bis 21 Tage in Spinner-Flaschen kultiviert worden sind, werden in mit Fibronectin beschichtete Petrischalen in einer Anfangsdichte von 2×10^5 Zellen/35 mm Petrischale in ein F-12 Medium überimpft, das 50 µg/ml Ascorbinsäure enthält. Die Zellkulturen 15 fließen innerhalb 6 Tagen zusammen. Sodann wird das Medium erneuert, und die Kulturen werden weitere 6 Tage inkubiert. Drei Kontrollkulturen werden mit Trypsin behandelt und danach werden die Zellen mit einem Coulter Zähler Modell D gezählt. Die Zelldichte beträgt etwa 1×10^6 Zellen pro Petri- 20 schale. Sämtliche anderen Petrischalen werden sodann mit Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS) gewaschen, 20 Minuten mit 20 mM wäßriger Ammoniaklösung behandelt und erneut dreimal mit PBS und sodann zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen, so daß keine Cytoskelette oder Kerne zusammen mit dem intakten ECM beobachtet werden können. Das 25 ECM wird mit einem Gummischaber gesammelt und gefriergetrocknet. Die Ausbeute an getrocknetem ECM-Pulver beträgt etwa 0,3 bis 1,0 mg pro Petrischale.

30 Das ECM wird in einer Menge von 5 bis 20 mg/ml, insbesondere 10 mg/ml verwendet.

Versuche mit Chondrocytengelen bei Vögeln und Säugern haben nach makroskopischer Untersuchung, im histologischen Schnitt 35 und durch biochemische Tests ergeben, daß die Transplantationsstelle innerhalb 2 bis 3 Monaten gut ausgefüllt und in die Umgebung

1 einschließlich der Oberflächen der Gelenkknorpel eingefügt
ist. Im Transplantat zeigen sich aktive proliferierende Knor-
pelzellen, die den typischen Stoffwechsel zeigen, und die
gut verbunden sind (ohne Faserknorpel oder anderes weiches
5 Gewebematerial an den Kanten) mit dem ursprünglichen Knorpel-
gewebe.

10

15

20

25

30

35

THIS PAGE BLANK (USPTO)